

# Laktoferrin som tilskudd for å forhindre sepsis hos premature

Betty Ann Bjerkreim

Kull v-10

Prosjektoppgave ved det medisinsk fakultetet

UNIVERSITETET I OSLO

## Forord

Denne artikkelen er skrevet som en obligatorisk prosjektoppgave ved medisinstudiet i Oslo. Studentoppgavens formål er fordypningsmuligheter i et medisinsk fagfelt, samt å skaffe seg erfaring med innsamling og vurdering av vitenskapelig data. Arbeidet med min studentoppgave startet allerede seinvinteren 2013 da jeg tok kontakt med Ola Didrik Saugstad som arbeider på avdeling for pediatriisk forskning ved Rikshospitalet.

Jeg bestemte meg tidlig for at pediatri var det medisinske fagfeltet jeg ønsket å fordype meg i. I pediatri er mye av medisinen samlet i et fag. Mens ulike sykdommer i ulike organer hos en voksen person er delt inn i hvert sitt fagfelt i medisinen, inkluderes de aller fleste organspesifikke sykdommene i pediatri. Samtidig skiller det også stort hvordan medisin utarter seg hos barn i forhold til hos voksne. Barn kommuniserer på en annen måte enn eldre mennesker og symptomer utarter seg annerledes. Diagnostiske tester kan være usikre og potensielt skadelige, som for eksempel røntgenstråler. I enkelte tilfeller må disse da utelates slik at man i mindre grad kan få et pålitelig svar fra supplerende tester, som i vanlige fall ofte trengs for å understøtte anamnese og kliniske undersøkelser. Samtidig er unge mennesker helt i starten av livet i stadig utvikling og endring. Spesielt spedbarn har stort utviklingspotensial og som helsearbeider har man påvirkningskraft til å rette opp eventuelle vansker og problemer som oppstår hos denne pasientgruppen, men også hos foreldre og andre omsorgspersoner.

I denne oppgaven har jeg valgt å konsentrere meg om de aller yngste pasientene innenfor pediatrien. Premature spedbarn er en svært utsatt gruppe. Deres 40 uker lange liv i et beskyttende miljø blir forstyrret og forkortet. Med svekket motstandskraft utenfor livmoren står utfordringene i kø i form av en rekke påvirkninger utenfra. Som et paradoks vil en rekke av påvirkningene tilføres som et forsøk på å motvirke de skadelige, men kan i verste fall forverre motstandskraften til de premature spedbarna. Da Ola Didrik tipset meg om et økende

internasjonalt fokus på laktoferrin som tilskudd til premature for å forhindre en rekke alvorlige tilstander hos slike spedbarn, bestemte jeg meg for at dette var et tema jeg ønsket å undersøke nærmere.

## Innledning

Alvorlige infeksjoner er en av de viktigste årsakene til død hos nyfødte på verdensbasis med over en million dødsfall hvert år. (1) I sykehus er insidens av infeksjoner hos småbarn 0,3-3%, mens ved intensivavdelinger for nyfødte er insidens 7-24,5%. Premature spedbarn er særlig utsatt og opp til 40% av dem med fødselsvekt under 1000 g eller der svangerskapet varte i mindre enn 28 uker får infeksjoner.

Antibiotika er den vanligste foreskrevne medisinen ved intensivavdelinger for spedbarn. Ved alle påviste bakterielle infeksjoner er dette standardbehandling. I industrielle land behandles 1% av spedbarn med antibiotika. Tegn og symptomer på sepsis er uspesifikke og empirisk antimikrobiell behandling startes rask som tiltak da en ubehandlet infeksjon kan få alvorlige konsekvenser, hvor spesielt sepsis har særdeles høy mortalitet. Bakteriekulturer fra relevante kroppsvæsker sikres ofte for å unngå et unødvendig bruk av antibiotika, men dette forhindrer allikevel ikke at mange premature spedbarn som ikke har infeksjoner allikevel mottar antibiotika mens de er innlagt på sykehus. Slik bruk ved negative bakteriekulturer kan få alvorlige konsekvenser som fremming av bakterieresistens, endring av tarmens kolonisering, økt risiko for kolonisering med *Candida* arter, økt risiko for død, nekrotiserende enterokolitt og sepsis. Siden antibiotika har så mange uønskede effekter, kan det være ønskelig å finne et alternativ til dette. Et annet viktig aspekt i diskusjonen rundt bruken av antibiotika er den globale veksten av mikrobiell antibiotikaresistens som et stort område for bekymring. (2)

Etter fødselen koloniseres spedbarnets tarm av ulike kulturer med mikrober. Det skjer en interaksjon mellom disse mikrobene og spesifikke overflatereseptorer på enterocytterne i tarmlumen. Denne interaksjonen trigger en respons som beskytter tarmens slimhinne fordi det forhindres at inflammatoriske cytokiner uttrykkes i for stor grad og man unngår dermed en inflammatorisk reaksjon. Det finnes også mange immunmodulerende faktorer i morsmelk og

medfødte faktorer kontrollerer også inflammatoriske responser som gir beskyttelse i tillegg til interaksjon mellom mikrober og tarmens epitel. En forskningsgruppe i Italia har kommet frem til lovende resultater med bruk av laktoferrin som et profylaktisk tiltak for å forhindre sepsis, som sekundært til dette vil kunne redusere bruk av antibiotika.

Råmelk og vanlig morsmelk er rik på proteiner og peptider som spiller en livsviktig rolle i det medfødte immunforsvaret ved at disse overføres til avkommet. På den måten kan modningen av spedbarnas immunitet fremskyndes. (3) Råmelk er den melka som produseres de første dagene etter fødselen. Et av proteinene som er naturlig forekommende i råmelk og vanlig morsmelk er laktoferrin. Laktoferrin tilhører transferrin-familien og er et jernbindende glykoprotein. Det har velkjente bakteriostatiske og baktericide egenskaper. Laktoferrin både produseres av og lagres i spesifikke nøytrofile granulocytter. Frigjøring skjer ved nøytrofil aktivering og påfølgende degranulering. (4) Andre egenskaper til dette glykoproteinet er beskyttelse av tarmens epitel, bidrag til vekst av bein og det fremskynder gjenoppretelse av immunsystemets funksjon hos immunsupprimerte dyr.

Det er ikke bare antibiotika som blir brukt i behandling ved infeksjoner hos spedbarn.

Parenteral ernæring, steroider, invasiv behandling og inneliggende katetre er alle tilleggsbehandlinger som er med på å endre tarmens naturlige flora og funksjon. (3) Siden ikke alltid behandling av en infeksjon ikke forhindrer alvorlige svikt og sekveler hos premature med sepsis, samt at risiko for ny infeksjon og redusert immunforsvar hos de premature paradoksalt nok øker, er den beste strategien å forhindre slike infeksjoner heller enn å behandle dem. Det er her laktoferrin kommer inn i bildet.

## Karakterisering av laktoferrin

Laktoferrin er det viktigste myseproteinet i brystmelk og er involvert i det medfødte immunforsvaret ved at det har antimikrobielle og immunmodulatoriske aktiviteter. Samtidig fremmer laktoferrin modning av mage-tarm systemet. (5-7) Bovint laktoferrin (bLF) viser aktivitet mot gram-positive og gram-negative bakterier, sopp og virus som rotavirus, enterovirus og adenovirus. Dette forsvaret inkluderer anti-lipopolysakkarider (mot gram-negative bakterier), anti-lipolytisk syre (mot grampositive bakterier) og komponenter med anti-*Candida* cellevegg aktivitet. Laktoferrin passerer gjennom magesekk og videre til tarm slik at virkningen kan skje gjennom hele tarmsystemet. Proteinets skille for det meste uforandret ut med avføring. Videre blir laktoferrin konvertert via pepsin og lav pH til et potent antimikrobielt peptid, laktoferricin. Dette peptidet kan utrydde patogene mikrober og binde eksotoksin i magesekk. Indirekte binder laktoferrin seg til jern og gjør det på den måten utilgjengelig for bakterier som trenger jern for å vokse. I tillegg forhindrer laktoferrin invasjon av bakterier fra tarm ved å blokkere adheransemolekyl for bakterier i tarmepitelet.

De immunmodulatoriske egenskapene til laktoferrin består i å redusere inflammasjon ved at produksjon av tumor nekrose faktor alfa (TNF $\alpha$ ) og andre proinflammatoriske molekyler avtar, og ved å regulere immunresponser slik at det beskytter mot alvorlig inflammasjon relatert til infeksjon og septisk sjokk. (7, 8) Dette kan bidra til å redusere mortalitet og svekket nevrologisk utvikling som er assosiert med blodbårne infeksjoner. Dessuten bidrar laktoferrin til proliferasjon og differensiering av tarmens celler, som er med på å styrke barrieren i mage-tarm og fremmer vekst til bakterier som utgjør normalfloraen, slik at det etableres en ønskelig mikroflora i tarm. (9)

Fordi colostrum inneholder høyeste innholdet av laktoferrin (6 g/L) versus 1-5 g/L i moden morsmelk), har naturen sikret tilleggsbeskyttelse med laktoferrin i en kort periode hos

fullbårne spedbarn, men hos premature trengs denne ekstra beskyttelsen over uker eller måneder. (5) VLBW (Barn med fødselsvekt < 1500 gram) spedbarn som ammes har utilstrekkelig beskyttelse fordi det i noen tilfeller kan ta 2-3 uker og av og til enda lenger før de tåler å innta all mat per os og før de da får tilstrekkelig av de beskyttende komponentene i brystmelk. Selv ikke dette er nødvendigvis tilstrekkelig, før spedbarna nærmer seg termin korrigert for alder.

Laktoferrin i kumelk, såkalt bovint laktoferrin (bLF) og laktoferrin i morsmelk (hLF) er til en stor grad homologe (77%) hva gjelder aminosyre-sammensetning. (9, 10) Både bLF og hLF er resistente mot proteolyse gjennom spedbarnets mage-tarm kanal, (11) binder seg til spesifikke reseptorer på enterocytene (12) og kan bli funnet intakte i avføring dersom denne har latt seg vanskelig absorbere fra tarmene. (13) In vitro vil bLF stimulere til celleproliferasjon og differensiering av tarm, og øke uttrykking av vekstfaktorer og cytokiner. (9) Disse mekanismene kan modulere tight junctions og inflammasjonskaskaden, og dermed være potensielle nøkkelmekanismer i det å forhindre infeksjoner.

## Metode

I denne artikkelen har jeg tatt for meg ferdigstilte randomiserte kontrollerte studier som er publiserte. Jeg gjorde et litteratursøk i Pubmed med søkeordene ”lactoferrin”, ”preterm infants” og ”infection”. Søket ble avsluttet 01.01.15. Resultatet av søket var 38 artikler.

Hovedmengden av disse artiklene er oversiktsartikler og systematiske kunnskapsoversikter.

Jeg fant kun én fullført randomisert kontrollert studie som omhandlet mine tre søkeord. Denne studien ble utført av en italiensk forskningsgruppe ledet av Manzoni og ble publisert i 2009.

De relevante oversiktsartiklene og systematiske kunnskapsoversiktene som jeg fant i mitt søk, refererer til denne studien. Jeg velger derfor å ta utgangspunkt i studien til Manzoni . Videre i metoddelen vil jeg beskrive metoden som ble brukt i denne italienske randomiserte kontrollerte studien.

### **Aktuelle originalstudie gjennomført av Manzoni m.fl.**

Mellom 1. oktober 2007 og 31. juli 2008 ble det registrert VLBW (<1500 g) spedbarn yngre enn 3 dager. (10) Dette var en multisenter studie fra 11 ulike nyfødtintensivavdelinger i Italia. Studien var på forhånd etisk godkjent og foreldre eller foresatte gav skriftlig informert samtykke.

Det primære målet med studien var å evaluere effekten av bovint laktoferrin, enten alene eller i kombinasjon med *Lactobacillus* GG, i å forebygge den første episoden med late-onset sepsis, forårsaket av bakterier eller sopp. Det sekundære målet var å vurdere etiologi (gram-positive/gram-negative bakterier og sopp), dødelighet før utskrivning fra sykehus (total og tilskrevet sepsis), forekomst av urinveisinfeksjoner, kolonisering av sopp, progresjon fra soppkolonisering til invasiv soppinfeksjon, nekrotiserende enterokolitt (NEC) av grad 2 eller alvorligere, threshold retinopathy of prematurity, alvorlig (grad 3-4) intraventrikulær



blødning, bronkopulmonal dysplasi, endret leverfunksjon, samt uønskede effekter og intoleranse.

Ekklusjonskriterier var manglende samtykke fra foreldrene, pågående soppdrepene profylakse, early-onset sepsis (før den tredje levedagen) eller leversvikt (verdier i serum av ASAT, ALAT, gamma-GT og direkte bilirubin som var tre ganger høyere enn referanseverdier). Alle de nyfødte spedbarna ble enten fulgt til død eller utskrivelse.

De nyfødte ble tilfeldig fordelt til en av tre grupper i et 1:1:1-forhold. Randomisering ble stratifisert etter sykehus og tilfeldig organisert i en spesifikk orden, blokker av størrelse på 9, 12 og 15 ble tatt i bruk. Den tilfeldige sekvensen av tildeling ble generert ved hjelp av `ralloc.adoversion 3.2.5` i Stata 9.2 (Statacorp, Vollege Station, Texas). Apotekene ved hvert sykehus brukte disse datagenererte randomiserte listene til å danne de tre gruppene og forberedte medisindosene. Både klinikere og forskere i sykehusstaben forble uvitende/blindet om studiegruppens oppgave gjennom hele studien.

Barna mottok enten bovin laktoferrin alene (100 mg/dag) (LF100; Dicofarm SpA, Roma, Italia) eller bovin laktoferrin i kombinasjon med *Lactobacillus* GG ( $6 \times 10^9$  koloni-dannende enheter/dag) (Dicoflor60; Dicoform SpA); kontrollgruppen mottok placebo (2 mL av en 5% glukoseløsning). Dosen med LGG som ble brukt, var tatt fra allerede publiserte data. Dosen med bovin laktoferrin, ble basert på gjennomsnitt av humant laktoferrin, som premature VLBW spedbarn inntar gjennom fersk morsmelk de første to leveukene (30-150 mg/dag). Hele mengden med bovin laktoferrin som ble tatt i bruk i studien, ble levert fra samme leverandør ved et og samme tidspunkt, og hadde en beregnet stabilitet på 2 år eller lengre. Forskningsgruppa bestemte seg for å ikke ha en fjerde gruppe som kun fikk tilskudd av LGG. Det manglet bevis som kunne tilskrive en effekt av LGG på late-onset sepsis hos VLBW spedbarn. Behandlingen varte seks (hvis fødselsvekt <1000 g) eller fire (hvis fødselsvekt

1001-1500 g) uker, med mindre spedbarna ble utskrevet tidligere. Det ble valgt ulik behandlingsvarighet på grunn av ulik varighet av risiko for sepsis. Medikamentene ble administrert fra og med dag tre etter fødselen. Administrasjonen bestod av en dose daglig hvor alle doser, inkludert placebo, ble fortynnet i forberedt melk, slik at man opprettholdt blinding.

Spedbarn som ikke klarte å spise selv de første 48 timene etter fødsel, mottok medikamenter eller placebo via orogastrisk tube. (10) Aspekter ved ernæring og mating fulgte en felles protokoll. Det ble oppfordret til amming. Hver mor skulle bare forsyne sitt eget barn med morsmelk. Dersom det var nødvendig ble det gitt tilskudd av morsmelkerstatning til VLBW spedbarna (PreAptamil; Milupa Italia, Milano, Italia) som ikke var tilsatt bovint laktoferrin.

Det ble utført systematisk overvåkning av bivirkninger (for eksempel oppkast, matintoleranse eller utslett) gjennom daglige undersøkelser av spedbarna, inntil to dager etter avsluttet behandling. Premature spedbarn har økt risiko for ernæringsrelatert kolestase. Men et tilskudd av bovint laktoferrin kan samtidig forbedre leverfunksjonen via antioksidative effekter. Derfor ble det gjennomført ukentlige overvåkninger av leverfunksjonen til spedbarna.

Late-onset sepsis ble definert som sepsis oppstått mer enn 72 timer etter fødsel, og før utskrivelse. Diagnosen bygget på kliniske tegn og symptomer, laboratoriefunn forenlig med sepsis, og påvist patogene organismer i blod, cerebrospinal- eller peritoneal væske.

Diagnostiske kriterier ble ut i fra eksisterende litteratur, retningslinjer fra internasjonale konsensusdokumenter og anbefalinger fra italienske spesialister. Kliniske tegn på sepsis, uten funn av patogene organismer i blod, cerebrospinal- eller peritoneal væske, ble ikke vurdert som late-onset sepsis.

For arter av *Staphylococcus* bakterien, inklusive koagulase-negative stafylokokker, ble det krevd to positive kulturer fra perifert blod tatt innen 48 timer, eller kun 1 positiv blodkultur

ledsaget av samtidig positiv kultur fra et sentralt venekateter (eller fra blod tatt fra sentralt venekateter) for samme organisme, for å stille diagnosen sepsis. I tilfeller med *Staphylococcus aureus* ble det kun krevd én positiv blodkultur. For alle mikroorganismer gjaldt det at dersom disse ble påvist i prøver tatt fra andre steder enn dem listet over, ble det sett på som kolonisering og ikke infeksjon. Spedbarna som ble utsatt for en episode av late-onset sepsis, fikk oppfølging og ble undersøkt for sekundære utfall helt til utskrivelse fra sykehus. (14)

Alvorlig bronkopulmonal dysplasi ble definert som bruk av oksygentilskudd i 28 dager med 30% oksygen eller mer, ventilasjon med positivt overtrykk ved 36 ukers gestasjonsalder, eller begge. Nekrotiserende enterokolitt ble definert som kliniske tegn med samtidig tilstedeværelse av pneumatosis intestinalis på røntgen oversikt abdomen etter Bell-kriteriene. Retinopathy of prematurity ble definert ut i fra studien "Early Treatment for Retinopathy of Prematurity". (15)

Urinveisinfeksjoner ble diagnostisert ved å påvise patogene organismer i urin tatt ved suprapubisk punksjon av blære eller blærekateterisering, med oppvekst av mer enn 100 000 bakterier/mL eller mer enn 10 000 sopp/mL.

Mortalitet som følge av sepsis ble definert som død innen 5 dager etter siste positive kultur fra ethvert sted uten at andre årsaker ble påvist, eller funn av patogene mikroorganismer ved obduksjon.

Tilstedeværelse og grad av intraventrikulær blødning ble dokumentert av det ultralydfunnet som viste minst hjerneskade; intraventrikulær blødning ble klassifisert i henhold til Papile-kriteriene. (16)

Soppkolonisering ble definert som vekst av minst én sopp isolert fra minst én overvåket kultur.

For å diagnostisere kolonisering av bakterier og sopp, samt progresjon fra soppkolonisering til infeksjon, ble det tatt kulturer fra ytre øregang og navlekateter ved fødsel; i tillegg ble det tatt prøver fra avføring, mageaspirat, rektum eller farynks hver uke i 6 uker. (10) Minst 3 av de 4 prøvestedene ble da undersøkt hver uke. Det ble også tatt dyrkningsprøver fra kirurgiske instrumenter etter fjerning av slike og fra alle områder som til enhver tid ble bestilt av legen.

Bakterier ble identifisert i laboratoriet ved bruk av standardiserte metoder. Arter av *Candida*-soppen ble inkubert på kromogene medier (Albicans ID; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for å kunne identifisere kolonier med *Candida albicans* som blåfargede etter 48 timer ved 37°C.

Alle primære og sekundære utfall ble presentert ved dikotome variabler (nærvær/fravær) og analysert i intention-to-treat.

Kategoriske prediktor-variabler ble presentert ved prosenter. Fødselsvekt, gestasjonsalder, Apgar score, antall dager mottatt en gitt behandling og daglig mengde melkeinntak, ble representert ved kontinuerlige variabler.

Gruppene som mottok bovint laktoferrin, enten alene eller i kombinasjon med LGG, ble sammenlignet hver for seg med kontrollgruppen, både totalt og fordelt i grupper etter fødselsvekt. Proporsjoner og kontinuerlige variabler ble sammenlignet med henholdsvis Fisher exact 2-tailed test og *t* test. Risiko rater (RR) og 95% konfidensintervall (KI) ble kalkulert til å sammenligne akkumulert forekomst av mellomgrupper ved hjelp av Stata version 9.2. Det ble tatt i bruk en multilevel (random-intercept) logistisk regresjonsmodell for å undersøke effekten av relevante risikofaktorer. Denne modellen tok hensyn til centerlevel varianskomponent. Kovarianter inkludert i studien ble valgt a priori på basis av deres kliniske relevans og inkluderte behandling (bLF/bLF+LGG/placebo), kjønn (gutt/jente), gestasjonsalder, fødselsvekt, ernæring (morsmelk/morsmelkerstatning/både morsmelk og

morsmelkerstatning/vanlig melk), bruk av H<sub>2</sub>-blokkere, bruk av postnatale steroider og daglig melkeinntak.

Wald testen ble brukt for å vurdere betydningen av de estimerte koeffisienter. Likelihood ratio testen ble brukt til å teste betydningen av centerlevel varianskomponent. Goodness-of-fit ble evaluert ved hjelp av log-likelihood av den tilpassede modellen. Alle testene var 2-tailed, og  $P < 0.5$  ble ansett som statistisk signifikant. Ingen justering ble gjort for multiple sammenligninger.

Analysen av utvalgsstørrelse viste at det var nødvendig med 114 pasienter i hver gruppe, basert på 2-sidig type 1 feilrater på 0.05 eller mindre, og en styrke på 80% for å oppdage en relativ forskjell mellom behandlede og ikke-behandlede spedbarn på minst 66% (nedgang fra 18% til 6%) av late-onset sepsis. Analysene viste at totalt 153 spedbarn i hver gruppe var nødvendig for å oppnå en styrke på 90%.

Forekomsten av late-onset sepsis ble også sammenlignet mellom spedbarn behandlet med bovint laktoferrin alene og dem som ble behandlet med bovint laktoferrin i kombinasjon med LGG. Siden det ikke ble funnet en signifikant forskjell mellom de to behandlingsgruppene, ble det utført en post hoc analyse for å sammenligne disse to gruppene med kontrollgruppen, både totalt og etter fødselsvekt. Men gitt den lave forekomsten av «late-onset» sepsis i begge behandlingsgruppene, var styrken på studien for lav til å oppdage mulig signifikante forskjeller. Forutsatt en innsidens på 6% i hver av behandlingsgruppene, hadde det vært nødvendig med 749 spedbarn i hver gruppe for å oppnå en styrke i studien på 80%, som dermed ville kunne påvise en relativ forskjell på 50%. 279 spedbarn fordelt i hver gruppe ville vært nødvendig for å påvise en forskjell på 75%.

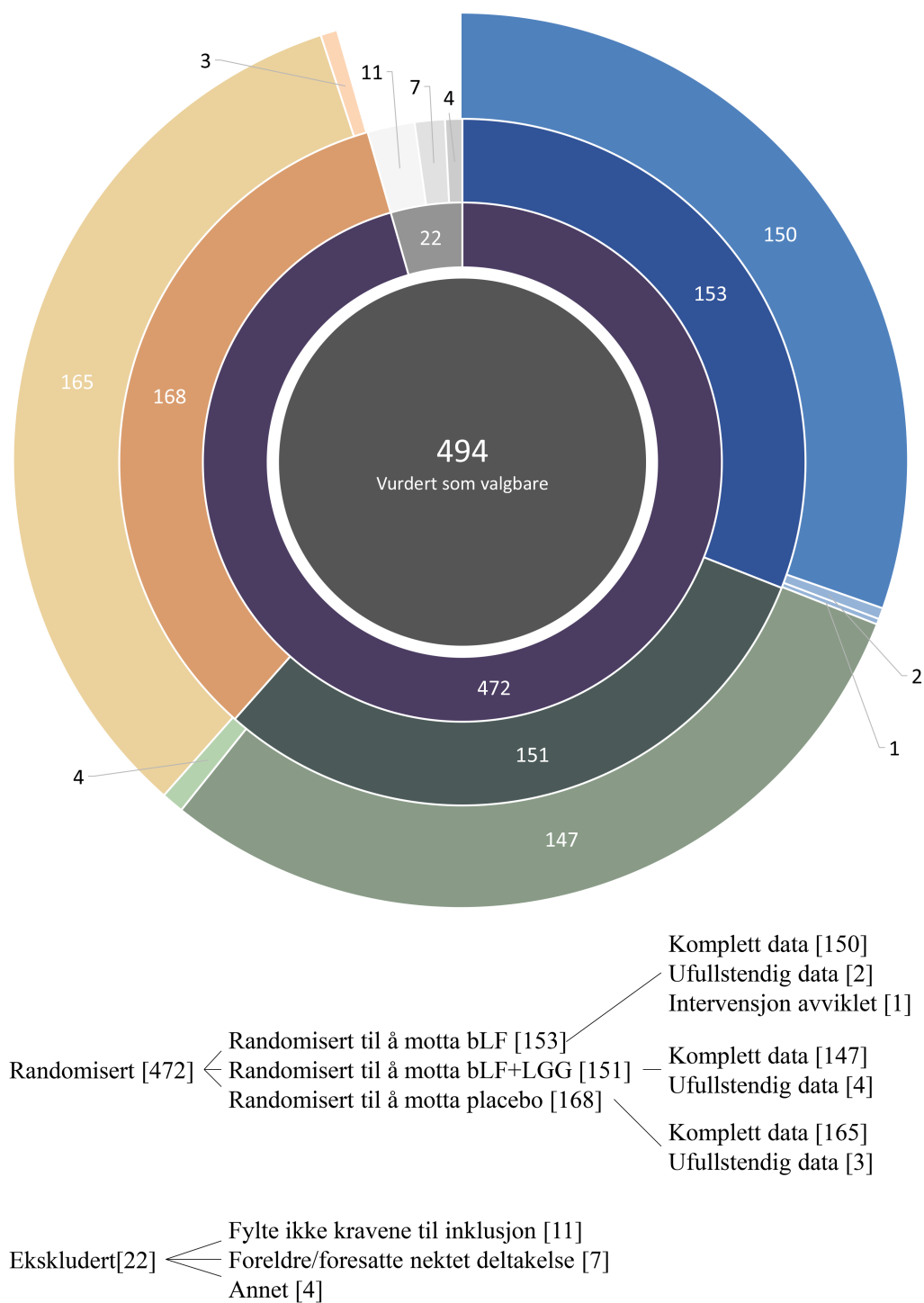
Det ble utført en analyse i forhold til ernæring som en undergruppe ved «late-onset sepsis» (LOS) (spedbarn matet med morsmelk eller morsmelkerstatning). (10) Denne studien manglet

styrke til å kunne oppdage statistisk signifikante forskjeller i analysen av denne undergruppen. Styrken på studien ble beregnet ved å bruke S-plus version 2000 (MathSoft, Cambridge, Massachusetts). Primære analyser ble gjennomført ved bruk av Stata 9.2.

## Resultater

I originalstudien gjennomført av Manzoni og hans medarbeidere i 2009, ble det valgt ut 494 premature spedbarn. De hadde en fødselsvekt <1500 g og overlevd >3 døgn. (10) 22 av disse ble forkastet som ikke kvalifisert (**FIGUR 1**). 472 spedbarn ble randomisert i tre grupper, bovint laktoferrin (bLF) (n=153), bovint laktoferrin (bLF) i kombinasjon med *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (n=151) eller placebo (n=168).

**Figur 1. Randomisering av spedbarn**





Et spedbarn i gruppen som fikk bLF fullførte ikke behandlingen, og mottok kun 8 doser, men ble allikevel inkludert i intention-to-treat analyse. Hos 9 spedbarn (2 i bLF, 4 i bLF+LGG og 3 i kontrollgruppen) forelå det ufullstendige data som ble inkludert i protokollen (FBC, CRP, trombocytter og blodglukose), men disse variablene ble ikke analysert. Alle de 472 spedbarna som ble tilordnet i randomiseringen, ble inkludert i analyse av studien. Tabell 1 viser fordelingen hva gjelder demografi, neonatale karakteristika og viktigste risikofaktorer for første episode med LOS. Det var ingen signifikant forskjell i baseline mellom gruppene i risikofaktorer for sepsis, behandling eller ernæring.

### **Late-onset sepsis**

45 spedbarn fikk sin første episode med LOS (**TABELL 1**), og det ble påvist 56 ulike utløsende patogener. (10)

I alt var det færre tilfeller av late-onset sepsis i gruppene som ble behandlet med bovint laktoferrin og bovint laktoferrin i kombinasjon med LGG (henholdsvis 9/153 [5.9%] og 7/151 [4.6%]) enn i kontrollgruppen (29/168 [17.3%]) (RR, 0.34; 95% KI, 0.17-0.70; P=0.002 for bovint laktoferrin vs placebo og RR, 0.27; 95% KI, 0.12-0.60; P<0.001 for bovint laktoferrin i kombinasjon med LGG vs placebo) (Tabell 1). Nedgangen gjaldt for så vel bakterier som sopp, men var ikke statistisk signifikant for gram-negative bakterier i gruppen som ble behandlet med bLF og heller ikke statistisk signifikant for sopp i gruppen som ble behandlet med bLF+LGG. Fordelingen av hva slags infiserende patogener, var ikke signifikant forskjellige i gruppene som mottok behandling og kontrollgruppen.

**Tabell 1. Late-onset sepsis forårsaket av sopp og bakterie, soppkolonisering, progresjon fra kolonisering til infeksjon, mortalitet**

Resultat	Antall/Total (%)			bLF vs Kontroll		bLF+LGG vs Kontroll	
	bLF (n=153)	bLF+LGG (n=151)	Kontroll (n=168)	RR (95% KI)	P-verdi	RR (95% KI)	P-verdi
<b>Late-onset sepsis forårsaket av sopp og bakterie</b>							
Total late-onset sepsis (totalt = 45)	9/153 (5.9)	7/151 (4.6)	29/168 (17.3)	0.34 (0.17-0.70)	0.002	0.27 (0.12-0.60)	<0.001
Gram negative bakterier	7/153 (4.6)	5/151 (3.3)	17/168 (10.1)	0.45 (0.19-1.06)	0.09	0.33 (0.12-0.87)	0.03
Gram positive bakterier	2/153 (1.3)	1/151 (0.7)	13/168 (7.7)	0.17 (0.04-0.74)	0.007	0.09 (0.01-0.65)	0.002
ELBW spedbarn	6/53 (11.3)	6/54 (11.1)	22/60 (36.7)	0.31 (0.14-0.70)	0.002	0.30 (0.13-0.69)	0.002
Fødselsvekt 1001-1500g	3/100 (3.0)	1/97 (1.0)	7/108 (6.5)	0.46 (0.12-1.74)	0.34	0.16 (0.02-1.27)	0.07
Fødselsvekt ≤ 750g	0/9 (0)	2/12 (16.7)	11/18 (61.1)		0.003	0.27 (0.07-1.02)	0.03
Gestasjonsalder ≤ 27 uker	5/35 (14.3)	6/37 (16.2)	19/46 (41.3)	0.35 (0.14-0.84)	0.01	0.39 (0.17-0.88)	0.02
<b>Invasive soppinfeksjoner</b>							
Total	0/153 (0)	2/151 (1.3)	9/168 (5.4)		0.004	0.25 (0.05-1.13)	0.07
ELBW spedbarn	0/53 (0)	2/54 (3.7)	6/60 (10.0)		0.03	0.37 (0.08-1.76)	0.28
Fødselsvekt 1001-1500g	0/100 (0)	0/97 (0)	3/108 (2.8)		0.25		0.25
<b>Progresjon fra soppkolonisering til sepsis</b>							
Total soppkolonisering	27/153 (17.6)	25/151 (16.6)	31/168 (18.5)	0.96 (0.60-1.53)	0.89	0.90 (0.56-1.45)	0.77
Progresjonsrate kolonisering/invasiv soppinfeksjon	0/27 (0)	2/25 (8.0)	9/31 (29.0)		0.002	0.28 (0.07-1.16)	0.09
<b>Mortalitet (før utskrivelse)</b>							
Total (alle årsaker)	4/153 (2.6)	6/151 (4.0)	12/168 (7.1)	0.37 (0.12-1.11)	0.07	0.56 (0.21-1.45)	0.24
Tilskrevet sepsis	0/153 (0)	1/151 (0.7)	8/168 (4.8)		0.008	0.14 (0.02-1.09)	0.24

I en post hoc analyse, ble det ikke funnet noen signifikant forskjell i andelen barn med LOS mellom bLF og bLF+LGG gruppene ( $P > 0.99$ ). Men styrken på studien var ikke god nok til å oppdage en forskjell mellom disse to gruppene.

Ved å justere for fødselsvekt, var nedgangen i LOS late-onset sepsis signifikant hos premature ELBW spedbarn ( $< 1000$  g) (RR, 0.31; 95% KI, 0.14-0.70;  $P = 0.002$  for bLF versus placebo og RR, 0.30; 95% KI, 0.13-0.69;  $P = 0.002$  for bLF+LGG versus placebo), mens det derimot ikke var signifikant nedgang hos spedbarn med fødselsvekt mellom 1001 og 1500 g (RR, 0.46; 95% KI, 0.12-1.74;  $P = 0.34$  for bLF versus placebo og RR, 0.16; 95% KI, 0.02-1.27;  $P = 0.07$  for bLF+LGG versus placebo) (Tabell 1).

En analyse av de to behandlingsgruppene i kombinasjon (bLF alene og bLF+LGG) versus kontrollgruppen som fikk placebo, viste en reduksjon av late-onset sepsis hos behandlede spedbarn (16/304 [5.3%] versus 29/168 [17.3%]) (RR, 0.26; 95% KI, 0.14-0.50;  $P < 0.001$ ). Nedgangen var signifikant både hos ELBW spedbarn med fødselsvekt  $< 1000$  g (12/107 [11.2%] versus 22/60 [36.7%];  $P < 0.001$ ) og med fødselsvekt fra 1001 til 1500 g (4/197 [2.0%] versus 7/108 [6.5%];  $P = 0.05$ ).

Ved å kontrollere for risikofaktorer, ble det for begge behandlingsgruppene bekreftet beskyttelse mot LOS (odds ratio, 0.32; 95% KI, 0.14-0.77 for bLF versus kontroll, og odds ratio, 0.21; 95% KI, 0.08-0.55 for bLF+LGG versus kontrollgruppen). (10) Residual variability var lav (intraclass correlation coefficient = 3.4%,  $P = 0.28$ ) Den andre statistisk signifikante prediktor for LOS var gestasjonsalder (odds ratio, 0.71; 95% KI, 0.57-0.89 for hver ekstra gestasjonsuke).

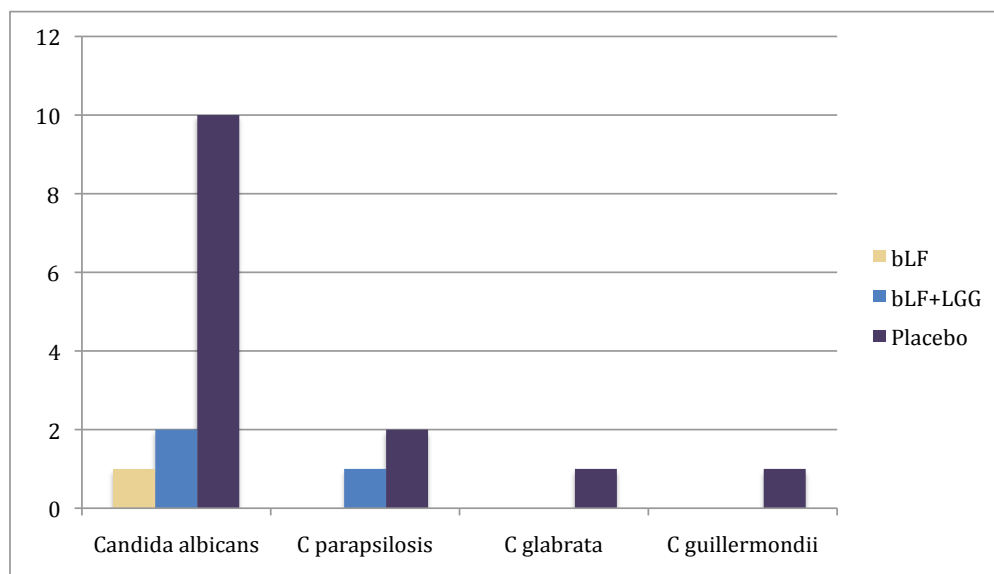
Mortalitet tilskrevet sepsis var signifikant lavere i de to behandlingsgruppene (0/153 [0%] med bLF og 1/151 [0.7%] med bLF+LGG, versus 8/168 [4.8%] med placebo;  $P = 0.008$  respektive  $P = 0.04$ ). Det ble derimot ikke funnet noen statistisk signifikant forskjell i total mortalitet (Tabell 1).

## Soppinfeksjoner

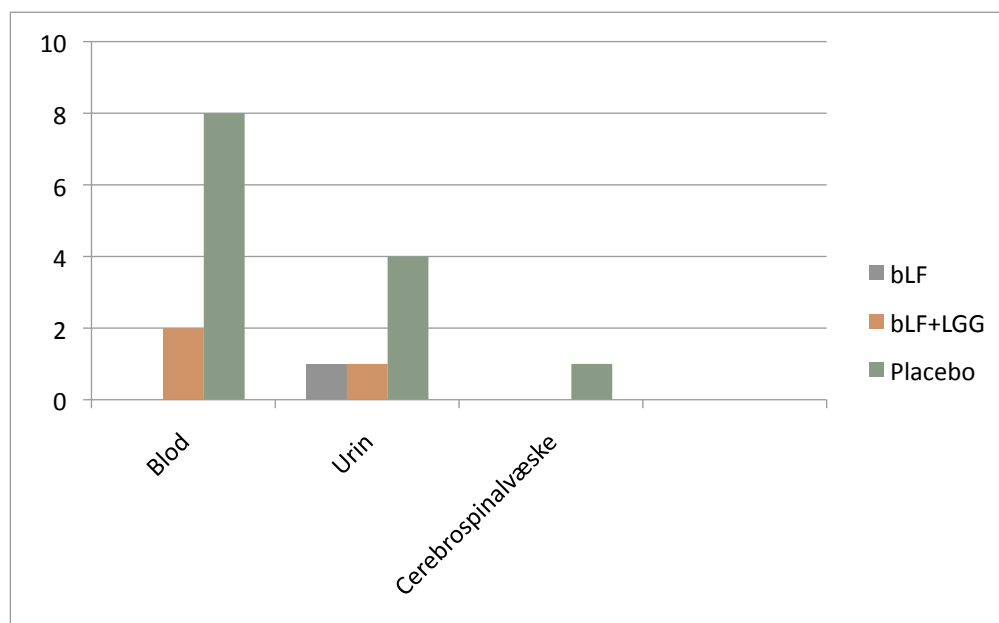
Tabell 1 viser hovedresultater, mens **FIGUR 2** og **FIGUR 3** viser fordeling av sopparter ved ulike infeksjonsfokus. *Candida albicans* utgjorde størsteparten av soppartene. Gruppen som mottok placebo hadde flest tilfeller av sepsis forårsaket av sopp. Totalt 18 spedbarn fikk sepsis forårsaket av sopp. Hele 14 av disse spedbarna mottok placebo. 1 spedbarn i gruppen som kun mottok bLF fikk slik sepsis, mens 3 spedbarn som mottok bLF i kombinasjon med LGG fikk sepsis forårsaket av sopp (Figur 2). Blod var hyppigste infeksjonsfokus for sopp. Her ble det isolert patogener i to av gruppene, de som mottok placebo og de som mottok

bLF+LGG. Det ble funnet sopp i urin hos alle de tre forsøksgruppene. Men det var totalt 10 spedbarn som fikk påvist sopp i blod var det 6 spedbarn som fikk påvist sopp i urin. Det var kun hos et spedbarn at det ble funnet sopp i cerebrospinalvæsken. Dette var i placebo-gruppen (Figur 3).

**Figur 2. Ulike arter av sopp som forårsaket sepsis**



**Figur 3. Ulike kroppsvæsker som infeksjonsfokus til arter av sopp**



Det var 11 spedbarn som fikk invasiv soppinfeksjon og det ble funnet 20 utløsende sopparter. I alt var insidens av kolonisering (minst et locus) med sopp lik i de tre gruppene ([17.6%] med bLF, [16.6%] med bLF+LGG, versus [18.5%] med placebo; henholdsvis  $P=0.89$  og  $P=0.77$  (Tabell 1). (17) Andel av spedbarn med en høy intensitet på koloniseringen ( $>3$  ulike loci samtidig kolonisert) var lavere i gruppene behandlet med bLF ([4.4%] med bLF alene, [3.3%] med bLF+LGG sammenlignet med [7.7%] med placebo), men forskjellen var ikke signifikant ( $P=0.10$ ).

Total andel invasive soppinfeksjoner var lavere i behandlingsgruppene (0/153 [0%] med bLF og 2/151 [1.3%] med bLF+LGG, versus 9/168 [5.4%] hos kontrollgruppen; henholdsvis  $P=0.004$  og  $P=0.07$ ). (17) Andel der man så progresjon fra kolonisering til invasiv soppinfeksjon var signifikant lavere i gruppen som fikk tilskudd med bLF alene, men ikke i gruppen som mottok bLF i kombinasjon med LGG (0/27 [0%] med bLF og 2/25 [8.0%] med bLF+LGG, versus 8/31 [25.8%] hos kontrollgruppen; henholdsvis  $P=0.005$  og  $P=0.09$ ). (Tabell 1).

I gruppene som fikk behandling med bLF (enten alene eller i kombinasjon med LGG), var invasive soppinfeksjoner sjeldnere både hos ELBW spedbarn (0/53 [0%] med bLF og 2/54 [3.7%] med bLF+LGG, versus 6/60 [10.0%]) og i gruppen spedbarn med fødsels vekt mellom 1001 og 1500 g (0/100 [0%] med bLF og 0/97 [0%] med bLF+LGG, versus 3/108 [2.8%]) (Tabell 1).

*Candida albicans* var den hyppigste arten, etterfulgt av *Candida parapsilosis* og noen andre. På grunn av de små mengder isolater var det kun mulig å påvise en signifikant forskjell mellom gruppene for *Candida albicans*. Her ble det påvist en reduksjon på 60% og 80% i behandlingsgruppene.

## Sekundære utfall

I begge behandlingsgruppene var insidens av soppputløste urinveisinfeksjoner 0.7% sammenlignet med 2.4% i gruppen som mottok placebo ( $P=0.37$  i begge tilfellene). Det ble ikke påvist noen forskjeller i verken primære eller sekundære utfall (Tabell 1 og **TABELL 2**) i behandlingsgruppene og kontrollgruppen ved å sammenligne spedbarn som kun ble matet med morsmelk med spedbarn som kun ble matet med morsmelkerstatning (data ikke vist i tabellene).

Det oppstod ingen dødsfall som skyldtes invasiv soppinfeksjon i behandlingsgruppene, sammenlignet med 2 dødsfall i gruppen som mottok placebo.

Nekrotiserende enterokolitt (NEC) i stadium 2 (Bell's Staging Criteria) oppstod sjeldnere hos spedbarna som mottok bLF+LGG (0/151 [0%]), enn i kontrollgruppen som mottok placebo (10/168 [6.0%]) ( $P=0.002$ ), men ikke i gruppen som mottok bLF alene. (10) Threshold retinopathy of prematurity oppstod sjeldnere med bLF (6/153 [3.9%]) versus med placebo 19/168 [11.3] ( $P=0.02$ ). Ingen av de andre sekundære utfallene var statistisk signifikant forskjellige mellom gruppene (Tabell 2).

Hos spedbarn som kun ble ernært med morsmelk, var det færre tilfeller av late-onset sepsis i behandlingsgruppene enn i kontrollgruppen (1/42 [4.2%] og 2/32 [6.3%] med henholdsvis bLF og bLF+LGG, versus 7/37 [18.9%] med placebo; henholdsvis  $P=0.02$  og  $P=0.16$ ). Det samme gjaldt for spedbarn som kun ble matet med morsmelkerstatning (1/24 [4.2%] og 0/26 [0%] med henholdsvis bLF og bLF+LGG, versus 4/22 [18.2%] med placebo; henholdsvis  $P=0.18$  og  $P=0.04$ ).

**Tabell 2. Sekundære utfall**

	Antall/Total (%)			P-verdi	
	bLF	bLF + LGG	Kontroll	bLF vs Kontroll	bLF + LGG vs Kontroll
<b>Prematuritetsretinopati behandlet med laser</b>	6/153 (3.9)	13/151 (8.6)	19/168 (11.3)	0.02	0.46
<b>Alvorlig (grad 3-4) intraventrikulær blødning</b>	6/153 (3.9)	4/151 (2.7)	2/168 (1.2)	0.16	0.43
<b>Bronkopulmonal dysplasi</b>	4/153 (2.6)	4/151 (2.7)	8/168 (3.6)	0.75	0.75
<b>Spedbarn som gjennomgikk større operasjoner, inklusive ligering av PDA</b>	5/153 (3.3)	2/151 (1.3)	3/168 (1.8)	0.49	0.99
<b>Død før utskrivelse fra sykehus, alle årsaker</b>	4/153 (2.6)	6/151 (4.0)	12/168 (7.1)	0.08	0.24
<b>NEC <math>\geq</math> stadium 2</b>	3/153 (1.9)	0/151 (0)	10/168 (6.0)	0.09	0.002
<b>Død eller NEC <math>\geq</math> stadium 2</b>	7/153 (4.6)	7/151 (4.6)	18/168 (10.7)	0.06	0.06
<b>Urinveisinfeksjoner</b>	4/153 (2.6)	6/151 (4.0)	10/168 (6.0)	0.18	0.45

Det ble verken funnet intoleranse eller skadelige effekter ved bruk av laktoferrin.

*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) ble ikke isolert fra kulturene i tarm. (10) Behandling med laktoferrin ble ikke stanset grunnet antatt skadelige virkninger, intoleranse eller potensielt farlig interaksjon med andre medikamenter. Da spedbarna var 4 uker gamle, ble nivå av leverenzymmer evaluert. Disse var innenfor referanseområdet, men signifikant lavere i begge behandlingsgruppene sammenliknet med kontrollgruppen. Insidens av hyperbilirubinemi som krevde lysbehandling var lik i alle 3 gruppene. Ingen spedbarn viste tegn til skade på lever eller kolestase.

## Diskusjon

Studien viste at bLF som ble administrert oralt, enten alene eller i kombinasjon med LGG, reduserte insidens av en første episode med late-onset sepsis hos VLBW spedbarn (<1500 g). Bovint laktoferrin hemmer veksten til en rekke bakterier, sopp, virus og parasitter. De involverte mekanismene inkluderer direkte virkning mot komponenter i cellemembran, immunmodulatoriske effekter og synergistisk effekt med anti-infeksiøse medikamenter. Mottakeligheten mikroorganismene har for den hemmende effekten til laktoferrin, er større i visse vekstfaser. (18) Denne mekanismen kan forklare hvorfor bLF ikke påvirket kolonisering av sopp, men derimot progresjon fra kolonisering til infeksjon. I studien som ble gjennomført av Manzoni og hans medarbeidere, var de gram-positive mikrobene i hovedsak stafylokokker, inkludert her koagulase-negative stafylokokker. Disse mikrobene forurenses huden rundt inngangsporten til sentrale venekatetre (CVK), mens gram-negative mikrober og Candida arter derimot går gjennom mage-tarm-systemet. De gunstige effektene av laktoferrin gjaldt for alle mikroorganismene, siden fordeling av type patogener som gav infeksjon, ikke var signifikant forskjellig i gruppene som fikk behandling med laktoferrin og kontrollgruppen. Videre studier trengs for å se på den ikke-signifikante reduksjonen av gram-positive og sopp, sammenlignet med gram-negative mikrober i behandlingsgruppene.

Gitt den store likheten mellom hLF og bLF, kan det argumenteres for at et supplement med bLF vil overlappe med morsmelk i å beskytte mot sepsis. Det var allikevel lik forekomst av late-onset sepsis hos spedbarn som ikke ble behandlet med bovin laktoferrin, uavhengig av om de ble ernært utelukkende med morsmelk eller morsmelkerstatning. (10) Videre var reduksjonen av episoder med late-onset sepsis hos behandlede spedbarn, sammenlignbare uavhengig av om det var morsmelk eller morsmelkerstatning som ble gitt. Dermed kan ikke



morsmelk alene gi fordelene som tilskudd av bLF gjør. Dette innebærer behov for ekstra laktoferrin, spesielt for å forhindre late-onset sepsis.

Den beskyttende effekten til bLF var tydelig blant spedbarn som veide under 1000 g, mens den ikke viste statistisk signifikans hos dem som veide mellom 1000 og 1500 g. Dette kan muligens forklares fordi ELBW spedbarna fikk høyere doser bLF per kilogram og lengre forløp av behandling. Andre muligheter som må vurderes og testes ut som hypoteser i nye studier er at det kanskje ikke gir noen effekt med tilskudd av bLF til nyfødte spedbarn > 1000 g. Viktig å bemerke er at konsentrasjon av hLF i morsmelk fra mødre til ELBW premature, er signifikant høyere enn i morsmelk fra mødre til spedbarn med høyere fødselsvekt. (19)

Tilskudd av bLF som blir administrert i konsentrasjoner justert for grad av prematuritet, vil muligens kunne føre til enda bedret utfall. En høyere dose bLF gitt over en lengre tidsperiode kan bli nødvendig i gruppen spedbarn som veier mellom 1001 og 1500 g.

*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) virker sammen med laktoferrin og øker beskyttelsen av den umodne tarmen. Selv om forekomst av late-onset sepsis i behandlingsgruppene var for lav til å tillate sammenligninger mellom bLF alene og bLF+LGG, ble det ikke observert noen synergistisk effekt av LGG med bLF i å forebygge sepsis, i motsetning til observert i studier på mus. (20) Det er mulig at LGG og bLF virker på samme mekanismer i mennesket og dermed ekskluderes en kumulativ effekt. Et annet alternativ er at siden bLF akselererer modning av tarmsystemet hos premature barn, kan dette overstyre de rapporterte effektene av LGG og være ansvarlige for en reduksjon av sepsis relatert til translokasjon av kjønnseller.

### **Begrensninger i originalstudien samt viktige punkter å ta hensyn til**

Studien til Manzoni har noen begrensninger. Generaliserbarhet er en potensiell begrensning; i tillegg hadde forsøket for lav styrke til å oppdage uønskede hendelser eller for å sammenligne de to behandlingsgruppene. (10) Det ble administrert en dose bLF basert på

gjennomsnittsinntak hLF som et spedbarn på 1000 g normalt inntar gjennom morsmelk i de første leveukene. Man bør undersøke om det skal tas i bruk forskjellige doser eller om spesielle tidspunkter på dagen i forhold til dosering vil passe bedre. Det ble ikke funnet noen uønskede effekter i behandlingsgruppene, dette i tråd med den betydelige likheten mellom bLF og hLF. Men selv om bLF ikke er rapportert som et melkeprotein ansvarlig for matintoleranse eller allergi, kan slike hendelser bli klinisk tydelige etter måneder eller år. Studien til Manzoni og kollegaene var begrenset i forhold til å vurdere spedbarn etter utskriving. Siden bLF har en bremsende effekt på betennelser, som er en hovedårsak til langtidskomplikasjoner etter late-onset sepsis, vil administrasjon av bLF i tillegg muligens ha positiv effekt i forhold til et langtidsperspektiv. Studier som følger effekten av bLF tilskudd over lengre tid vil derfor være ønskelige.

Sepsis er den viktigste årsaken til død og nevrologiske svekkelser i et langtidsperspektiv hos premature VLBW spedbarn (<1500 g). (1, 21) For å forhindre spedbarnssepsis er man avhengig av god hygiene, forsiktig bruk av invasive prosedyrer, rett bruk av medisiner, administrasjon av frisk morsmelk og tidlig diagnose. Likevel er ingen av disse tiltakene fullt ut effektive i å redusere byrden av sykdommen, og samlet sett har de heller ikke vært utsatt for randomiserte kontrollerte studier. Studien til Manzoni og hans kollegaer har vist at et tilskudd av bLF, enten alene eller i kombinasjon med LGG, reduserer de første episodene av late-onset sepsis hos VLBW spedbarn.

### **Humant eller bovin laktoferrin?**

Studien som ble gjennomført av Manzoni og hans forskningsteam brukte bovin laktoferrin (bLF) som tilskudd istedenfor human laktoferrin (hLF). (10) Både bLF og hLF har høy homologi (77%). Dagens industri kan produsere høyt rensed bLF men også rekombinant hLF. Bovin laktoferrin og laktoferricin viser større antimikrobiologisk aktivitet sammenlignet med

human laktoferrin. Allikevel vil det i fremtidige studier være viktig å undersøke nærmere for å finne svar på hvor trygt og effektivt bLF er i forhold til hLF som tilskudd til premature spedbarn, samt finne den optimale dosen for begge typene laktoferrin.

## Konklusjon

- Basert på funnene i enkeltstudien gjennomført av Manzoni og hans medarbeidere reduserer profylaktisk bruk av bovint laktoferrin insidens av late-onset sepsis hos spedbarn med fødselsvekt under 1500 g, og er da aller mest effektivt hos spedbarn under 1000 g.
- Det var en lavere andel invasive soppinfeksjoner og tilfeller med progresjon fra kolonisering til invasiv soppinfeksjon hos spedbarna som fikk tilskudd av bovint laktoferrin.
- Det ingen bevis for at bovint laktoferrin gitt alene er effektivt i beskyttelse mot nekrotiserende enterokolitt hos premature spedbarn. Det var kun i kombinasjon med LGG at det viste seg å signifikant forhindre NEC i studien.
- Profylaktisk bruk av laktoferrin beskyttet mot prematuritetsretinopati.
- Av andre sekundære utfall som intraventrikulær blødning og bronkopulmonal dysplasi, ble det ikke påvist statistisk signifikante forskjeller mellom gruppene.
- Resultatene av denne studien gir mulighet til å gjøre videre forskning på laktoferrin til en prioritet.
- Ekstremt premature barn er en svært sårbar del av befolkningen og det er viktig å bevege seg fremover raskt nok, slik at man forhindrer nosokomiale infeksjoner og infeksjonsrelatert dødelighet og mortalitet.

Fremtidig forskning bør være rettet mot å bekrefte sikkerhet og effekt av laktoferrin hos VLBW spedbarn, inkludert mer ekstremt premature barn, fordi de potensielt vil dra mest nytte av laktoferrin. (5) Kombinasjonsstrategier, for eksempel bruk av bLF+LGG i studien av Manzoni og hans forskningsgruppe, og stoffer som kan påvirke laktoferrins aktivitet, som for

eksempel jerntilskudd, bør undersøkes. Lengde på sykehusoppholdet, samt kostnader bør også studeres.

Videre forskning på laktoferrin er i gang. Det er startet en randomisert, placebo-kontrollert studie for å vurdere et rekombinant hLF som tilskudd for å forhindre neonatale infeksjoner hos spedbarn som veier mellom 750 og 1500 g ved hjelp av en dosering på 150 mg/kg hver 12. time. Manzoni og kollegaene hans studerer videre effekten bLF alene eller i kombinasjon med LGG har på det primære endepunktet ved nekrotiserende enterokolitt.

1. Stronati M, Bollani L, Maragliano R, Ruffinazzi G, Manzoni P, Borghesi A. [Neonatal sepsis: new preventive strategies]. *Minerva pediatrica*. 2013;65(1):103-10.
2. Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge. *The New England journal of medicine*. 2009;360(5):439-43.
3. Zimecki M, Artym J. [Therapeutic properties of proteins and peptides from colostrum and milk]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. 2005;59:309-23.
4. Giunta G, Giuffrida L, Mangano K, Fagone P, Cianci A. Influence of lactoferrin in preventing preterm delivery: a pilot study. *Molecular medicine reports*. 2012;5(1):162-6.
5. Kaufman DA. Lactoferrin supplementation to prevent nosocomial infections in preterm infants. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009;302(13):1467-8.
6. Yamauchi K, Wakabayashi H, Shin K, Takase M. Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infections. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2006;84(3):291-6.
7. Berlutti F, Schippa S, Morea C, Sarli S, Perfetto B, Donnarumma G, et al. Lactoferrin downregulates pro-inflammatory cytokines upexpressed in intestinal epithelial cells infected with invasive or noninvasive *Escherichia coli* strains. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2006;84(3):351-7.
8. Otsuki K, Yakuwa K, Sawada M, Hasegawa A, Sasaki Y, Mitsukawa K, et al. Recombinant human lactoferrin has preventive effects on lipopolysaccharide-induced preterm delivery and production of inflammatory cytokines in mice. *Journal of perinatal medicine*. 2005;33(4):320-3.
9. Buccigrossi V, de Marco G, Bruzzese E, Ombrato L, Bracale I, Polito G, et al. Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. *Pediatric research*. 2007;61(4):410-4.

10. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pagni L, Romeo MG, Messner H, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009;302(13):1421-8.
11. Davidson LA, Lonnerdal B. Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta paediatrica Scandinavica*. 1987;76(5):733-40.
12. Kawakami H, Lonnerdal B. Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *The American journal of physiology*. 1991;261(5 Pt 1):G841-6.
13. Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;77(6):1537s-43s.
14. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Annals of surgery*. 1978;187(1):1-7.
15. Good WV, Hardy RJ, Dobson V, Palmer EA, Phelps DL, Quintos M, et al. The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the early treatment for retinopathy of prematurity study. *Pediatrics*. 2005;116(1):15-23.
16. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *The Journal of pediatrics*. 1978;92(4):529-34.
17. Manzoni P, Stolfi I, Messner H, Cattani S, Laforgia N, Romeo MG, et al. Bovine lactoferrin prevents invasive fungal infections in very low birth weight infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics*. 2012;129(1):116-23.

18. Bortner CA, Arnold RR, Miller RD. Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*: effect of the physiological state of the organism. *Canadian journal of microbiology*. 1989;35(11):1048-51.
19. Ronayne de Ferrer PA, Baroni A, Sambucetti ME, Lopez NE, Ceriani Cernadas JM. Lactoferrin levels in term and preterm milk. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000;19(3):370-3.
20. Sherman MP, Bennett SH, Hwang FF, Yu C. Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus GG*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2004;17(3):285-9.
21. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;292(19):2357-65.